

· 论 著 ·

重组腺相关病毒介导的 RNAi 抑制血管生长素表达对肺鳞癌细胞成瘤能力的影响

袁 扬, 刘晓红, 龚德军, 李白翎, 黄盛东*

(第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**通过腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)抑制肺鳞癌细胞 SK-MES-1 的血管生长素(angiogenin, ANG)表达, 观察其对癌细胞生长及成瘤能力的影响。**方法:**构建 H1 启动子驱动的表达针对 ANG 的小干扰 RNA(siRNA)重组腺相关病毒 AAV-shANG, 转染 SK-MES-1 细胞; 同时以正常 SK-MES-1 细胞以及转染 AAV-Null 的 SK-MES-1 细胞作为对照。培养 72 h 后, 蛋白质印迹法检测 3 组细胞 ANG 蛋白表达变化, 并检测细胞周期。将以上 3 组细胞移植胸腺缺陷小鼠观察其生长和成瘤能力的变化, 并进行微血管密度计数。**结果:**成功构建重组腺相关病毒 AAV-shANG, 转染 SK-MES-1 细胞后 ANG 蛋白表达水平为两对照组细胞的 20%, 细胞增殖指数未见差异。AAV-shANG 转染细胞在胸腺缺陷小鼠中的成瘤体积、瘤质量和微血管密度均较两对照组细胞显著下降($P < 0.05$)。**结论:**腺相关病毒介导的 shANG 表达能有效抑制 SK-MES-1 细胞中 ANG 蛋白表达, 抑制其成瘤能力, 对肺鳞癌的治疗具有重要的意义。

[关键词] 血管生长素; 腺相关病毒; RNA 干扰; 基因疗法; 肺肿瘤

[中图分类号] R 730.231 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0355-05

Recombinant adeno-associated virus mediated RNA interference of angiogenin inhibits growth of human lung squamous cancer cells

YUAN Yang, LIU Xiao-hong, GONG De-jun, LI Bai-ling, HUANG Sheng-dong* (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To inhibit the expression of angiogenin (ANG) by recombinant adeno-associated virus (AAV) mediated RNA interference (RNAi) and to observe its influence on the growth of human lung squamous cancer cells line, SK-MES-1. **Methods:** A recombinant adeno-associated virus vector was constructed and used to deliver small hairpin RNA (shRNA) targeting ANG into SK-MES-1 cells; SK-MES-1 cells and SK-MES-1 cells transfected with AAV-Null were taken as control. The inhibitory effect of adeno-associated virus mediated RNAi on ANG expression and subsequent influence on the growth, tumorigenesis, and microvessel density of SK-MES-1 tumors were also evaluated. **Results:** *In vitro* experiment showed that AAV-shANG was successfully constructed. Western blotting revealed that AAV-shANG effectively infected SK-MES-1 cells and the expression of ANG was obviously decreased 72 h after transduction. *In vivo* study showed that, compared with the other 2 groups, the suppression of ANG in AAV-shANG group significantly inhibited the growth of SK-MES-1 cells and decreased the MVP in nude mice ($P < 0.05$). **Conclusion:** The constructed AAV-shANG can effectively inhibit ANG protein expression in SK-MES-1 cells, which paves a way for the therapy of human lung squamous cancer.

[KEY WORDS] angiogenin; adeno-associated virus; RNA interference; gene therapy; lung neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 355-359]

血管新生是体内实体瘤生长和转移重要环节, 恶性肿瘤的侵袭、转移均与肿瘤血管生成密切相关。血管生长素(angiogenin, ANG)是一种能有效促进新生血管内皮细胞生长的单链碱性蛋白^[1], 在多种肿瘤组织中出现 ANG 表达升高, 血管内皮细胞比例增加现象, 在肿瘤发生的不同阶段, 刺激新生血管形成。有学者^[2]认为可通过抑制 ANG 表达的途径抑制肿瘤血管的生长以达到治疗肿瘤的目的。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指由双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)引发的转录

后基因沉默机制, 高效特异的抑制目的基因表达, 特别是应用小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)在动物细胞引起的 RNAi, 已成为研究基因功能的有效工具, 也为肿瘤基因治疗开拓新的思路^[3]。

[基金项目] 上海市科委重点项目(04JC14006). Supported by Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (04JC14006).

[作者简介] 袁 扬, 实习研究员。

* Corresponding author. E-mail: shengdonghuang@gmail.com

本研究构建表达针对 ANG 的 siRNA 的重组腺相关病毒 AAV-shANG, 转染肺鳞癌细胞, 通过抑制 ANG 表达观察癌细胞生物学行为的变化, 探讨 ANG 在肺鳞癌发生过程中的作用, 为下一步利用 RNAi 技术抑制肿瘤血管生长达到基因治疗目的奠定基础。

1 材料和方法

1.1 重组腺相关病毒质粒(pAAV-shANG)构建与重组腺相关病毒(AAV-shANG)制备

1.1.1 重组质粒 pAAV-shANG 构建 重组腺相关病毒系统采用 AAV Helper-free System (购自 Strategene 公司)。以带 H1 启动子的真核表达质粒 pENTR/H1 (购自 Invitrogen 公司) 为模板, 设计正向引物 5'-CGC GTC GAC ATT GAC CGA CAA TTG CA-3'; 反向引物 5'-CCA AGC TTG AGT GGT CTC ATA CAG AAC-3' (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成), PCR 扩增获得 H1 启动子序列; 反应条件: 94℃ 变性 1 min; 随后 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 反应 30 个循环; 最后 68℃ 延伸 6 min。回收 PCR 产物, *Sal* I / *Hind* III 顺序酶切后与同样双酶切的腺相关病毒载体质粒 pAAV-MCS 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定转化子获得重组质粒 pAAVH1。针对 ANG 的 RNAi 位点, 设计 Oligo DNA 正义链 5'-GAT CCC TGA TGA GGC GCC GGA ATA TTT CAA GAG AAT ATT CCG GCG CCT CAT CAT TTT TT-3' 及反义链 5'-AGC TAA AAA AAT GAT GAG GCG CCG GAA TAT TCT CTT GAA ATA ATT CCG GCG CCT CAT CAG G-3' (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。5' 和 3' 粘端分别与 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后粘端一致, 退火形成双链 DNA, 与 *Bam*H I / *Hind* III 顺序酶切重组质粒 pAAV H1 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定转化子, 挑选阳性克隆测序鉴定, 确认获得重组质粒 pAAV-shANG。Plasmid Purification Midi Kit (购自 QIAGEN 公司) 抽提高纯度重组质粒用于细胞转染实验。

1.1.2 重组腺相关病毒 AAV-shANG 获取 应用磷酸钙转染法将重组质粒 pAAV-shANG 10 μ g 与辅助质粒 pHelper 和 pAAV-RC 各 10 μ g (购自 Strategene 公司) 共转染 AAV-293 细胞, 72 h 后, 收获细胞, 反复冻融 4 次完全裂解细胞, 离心收获上清, 获取重组腺相关病毒 AAV-shANG。测定重组腺相关病毒滴度。

1.2 重组腺相关病毒 AAV-shANG 转染肺鳞癌细胞 SK-MES-1 体外实验

1.2.1 AAV 转染肺鳞癌细胞 SK-MES-1 24 孔培养板培养 SK-MES-1 细胞至密度约 80% 时, 随机取 3 孔细胞计数, 按 MOI 值 100 加入重组腺相关病毒 AAV-shANG, 取 3 孔细胞计数后按 MOI 值 100 加入空腺相关病毒 AAV-Null, 另取 3 孔细胞计数后不加腺相关病毒。

1.2.2 Western 印迹法检测转基因 SK-MES-1 细胞中 ANG 蛋白表达 分别收集培养 72 h 后的正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞、AAV-shANG 转染细胞, 5% SDS 裂解细胞, 细胞裂解上清液经 SDS-PAGE 蛋白电泳, 转印至硝酸纤维素膜上, 经过小鼠抗人 ANG 单抗 (购自 Santa Cruz 公司) 和羊抗小鼠 IgG-HRP 多抗两步免疫反应, 免疫化学发光显色, 以 β -actin 为内参照, 检测 3 组细胞 ANG 蛋白表达量。

1.2.3 转基因 SK-MES-1 细胞细胞周期检测 分别收集正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞、AAV-shANG 转染细胞的对数生长中期细胞, 按常规方法进行细胞周期检测, 计算细胞的增殖指数 (proliferation index, PI), 公式为: $PI = (S + G_2) / (S + G_2 + G_1)$ 。

1.3 重组腺相关病毒 AAV-shANG 转染肺鳞癌细胞 SK-MES-1 体内实验

1.3.1 裸鼠成瘤实验 实验裸鼠随机分为 3 组, 每组 3 只。在裸鼠背部皮下分别注射正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞、AAV-shANG 转染细胞各 1×10^7 / 只。接种 30 d 后测量形成肿瘤的长度 (L) 和宽度 (W), 依据公式计算肿瘤体积 $V = 0.5 \times L \times W^2$ 。处死小鼠, 取出瘤体称质量。

1.3.2 微血管密度 (microvessel density, MVD) 计数 3.7% 的中性甲醛溶液固定肿瘤组织, 石蜡切片, 0.3% 过氧化氢溶液室温下孵育 10 min, DAB 显色, 苏木精衬染, 在光镜下行微血管密度计数。在 200 倍镜下计数 5 个热点区的血管数, 取其平均值作为该只裸鼠肿瘤的 MVD。取同一组 3 只裸鼠肿瘤的平均 MVD, 作为该组种植性肿瘤的平均 MVD。

1.4 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 用 t 检验比较各组间差别。

2 结果

2.1 H1 启动子获取 预期扩增包含 H1 启动子序

列约 200 bp,PCR 产物电泳结果显示,片段大小与理论计算值相符(图 1)。

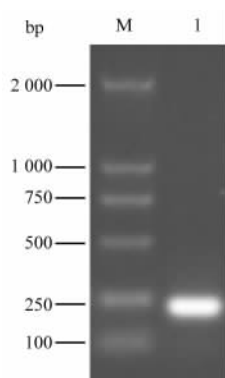


图 1 PCR 扩增 H1 启动子序列产物的电泳图

Fig 1 PCR amplification of H1 promoter

M:DNA marker; 1:H1 promoter

2.2 重组质粒 pAAV-H1 构建 随机挑选的 5 个转化子,经 PCR 鉴定,全为阳性克隆(图 2)。

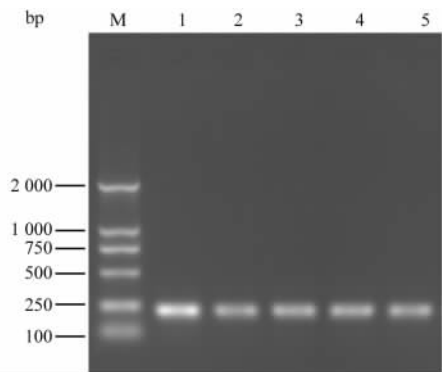


图 2 重组质粒 pAAV-H1 PCR 鉴定

Fig 2 Electrophoresis pattern of pAAV-H1 PCR product

M:DNA marker; 1-5:Recombinant plasmid pAAV-H1 PCR product

2.3 重组质粒 pAAV-shANG 构建 随机挑选的 5 个转化子,经 PCR 鉴定,全为阳性克隆(图 3)。经测序确认,H1 启动子序列与公司提供的序列一致,表达针对 ANG 的 shRNA 序列已正确接入到 H1 启动子的 3'端。

2.4 重组腺相关病毒 AAV-shANG 获取及滴度测定 重组质粒 pAAV-shRNA 与辅助质粒 pHelper/pAAV-RC 共转染 AAV293 细胞 72 h 后出现大量细胞变圆、漂浮和死亡的现象,未转染质粒的细胞依然单层贴壁生长(图 4)。测定收获的重组腺相关病毒 AAV-shANG 滴度为 7.0×10^7 IU/ml。

2.5 转基因 SK-MES-1 细胞中 ANG 蛋白表

达 经灰度扫描,在对照 β -actin 蛋白表达量基本不变的情况下,ANG 在正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞蛋白表达量基本相同,而在 AAV-shANG 转染组 ANG 表达量明显降低,为对照组 β -actin 的 20% (图 5)。

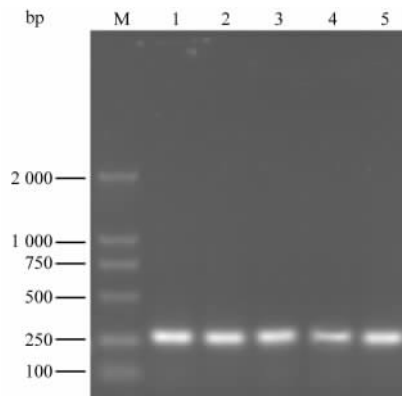


图 3 重组质粒 pAAV-shANG PCR 鉴定

Fig 3 Electrophoresis pattern of pAAV-shANG PCR product

M:DNA Marker; 1-5:Recombinant plasmid pAAV-shANG PCR

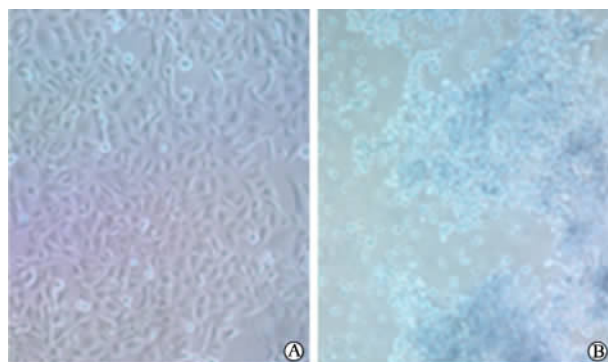


图 4 pAAV-shANG/pHelper/pAAV-RC 共转染 AAV293 细胞产生 AAV-shANG

Fig 4 pAAV-shANG/pHelper/pAAV-RC co-transfected AAV293 cells and production of AAV-shANG($\times 200$)

A: AAV-293 cells transfected with culture medium after 3 days; B: AAV293 cells co-transfected with pAAV-shANG/pHelper/pAAV-RC after 3 days

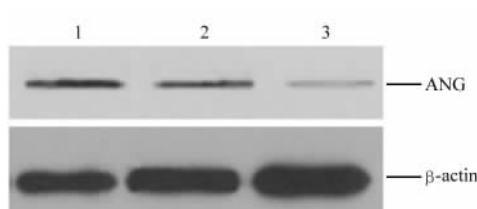


图 5 Western 印迹法检测 ANG 蛋白表达

Fig 5 Western blot analysis of angiogenin expression

1:SK-MES-1 cells untransfected with AAV;2:SK-MES-1 cells transfected with AAV-Null;3:SK-MES-1 cells transfected with AAV-shANG

2.6 转基因 SK-MES-1 细胞细胞周期分析 正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞和 AAV-shANG 转染细胞 PI 分别为 0.317 ± 0.290 、 0.325 ± 0.380 和 0.309 ± 0.430 , 各组细胞增殖指数差异无统计学意义。

2.7 裸鼠体内成瘤实验 3 组细胞接种裸鼠后约 7~10 d, 可见肿瘤生长。接种 30 d 后, 正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞和 AAV-shANG 转染细胞 3 组瘤体体积分别为 (695.3 ± 107.2) 、 (764.0 ± 135.5) 、 $(373.4 \pm 83.4) \text{ mm}^3$, 质量分别为 (458.1 ± 66.5) 、 (495.7 ± 87.1) 、 $(244.9 \pm 48.6) \text{ mg}$, 经统计分析, AAV-shANG 转染细胞组与正常

SK-MES-1 细胞和 AAV-Null 转染细胞组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果表明, AAV-shANG 转染细胞的成瘤性显著低于 AAV-Null 转染细胞和正常 SK-MES-1 细胞。

2.8 MVD 计数结果 见图 6。正常 SK-MES-1 细胞、AAV-Null 转染细胞和 AAV-shANG 转染细胞 3 组 MVD 结果分别为 9.4 ± 1.5 、 9.8 ± 2.1 和 5.7 ± 1.9 , 经统计分析, AAV-shANG 转染细胞组与正常 SK-MES-1 细胞和 AAV-Null 转染细胞组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果表明, AAV-shANG 转染细胞组肿瘤组织内新生血管数目显著低于 AAV-Null 转染细胞组和正常 SK-MES-1 细胞组。

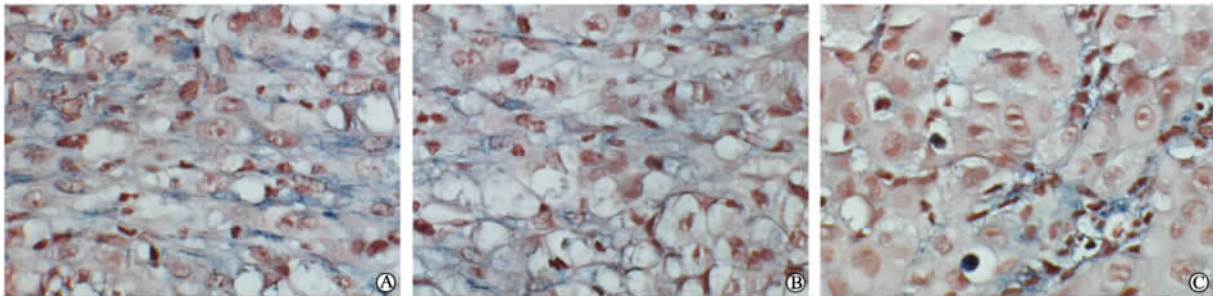


图 6 肿瘤组织微血管密度计数

Fig 6 Determination of micro-vessel density (MVD) of tumor tissues ($\times 200$)

A; SK-MES-1 cells untransfected with AAV; B; SK-MES-1 cells transfected with AAV-Null; C; SK-MES-1 cells transfected with AAV-shANG

3 讨论

肿瘤的生长、侵袭及转移过程受到各种因素调控, 其中肿瘤组织中新生血管对实体瘤的生长起重要作用, 为肿瘤生长提供持续的营养供应^[4]。在促进新生血管的形成的细胞因子中, 血管生长素 (ANG) 是非常重要的一种。ANG 是一种单链蛋白质, 相对分子质量为 14 100, 属于 RNA 酶 A 的超家族成员, 由 123 个氨基酸残基组成^[5]。ANG 蛋白生物学功能有: (1) 核糖核酸酶活性作用: 在血管生成因子中, ANG 是惟一有核糖核酸酶活性的因子。ANG 的底物比 RNase 少得多, 它是一个高度特异的核糖核酸酶。ANG 的核糖核酸酶活性是其促血管生成功能所必需的^[6]。(2) 促进血管生成作用: 在生理状态下, ANG 的表达受到严格的调控, 缺氧^[7]及局部浸润的巨噬细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 等因子能诱发 ANG 表达的增加, 从而促进血管的生成^[8]。ANG 促血管新生活性可能比 VEGF 和 FGF 更强^[9], 它在内皮细胞、成纤维细胞及平滑肌细胞上均

有受体, 因此认为 ANG 是一种重要的促血管形成因子, 具有促血管形成和增加血管通透性的双重功能, 在肿瘤的发展、转移及预后等方面均起着重要的作用。利用反义 RNA^[10] 和 ANG 单克隆抗体^[11] 抑制 ANG 的转录与表达, 可抑制人类某些肿瘤在无胸腺小鼠体内的移植生长, 但整体而言效果不甚理想。近几年来兴起的 RNA 干扰技术, 为肿瘤的分子生物治疗开辟了新的途径。与传统基因沉默技术相比, RNA 干扰具有效果强、持续时间长、技术流程简便、周期短, 以及在细胞内表达的稳定性、可传递性、高效性等优势, 目前这一技术已在肿瘤的基因治疗方面显示出诱人的前景^[12]。

以往的基因治疗研究多选用质粒或者病毒作为转基因载体。真核表达质粒由于转染效率低、基因表达时间短的缺陷决定了其不是一种理想的转基因载体。在多种病毒载体中, 腺病毒以其对动物细胞的高转染效率得到广泛使用, 但是其可引发实验动物的免疫反应, 而且 0.5~1 个月的表达时间也限制了它的应用。

本研究选择 AAV 作为基因转移的载体。AAV 是一种无包膜的人单链 DNA 病毒,属于细小病毒属。重组 AAV 由于其宿主范围广、免疫原性低、表达携带基因长久等优点而越来越多地被用于基因治疗的实验研究。本研究采用的 AAV 病毒系统由病毒质粒 pAAV-MCS 提供 ITR 序列, pAAV-RC 提供 Rep 蛋白和 Cap 蛋白, pHelper 质粒代替腺病毒提供 AAV 重组的辅助调控,不需要腺病毒的参与,避免了腺病毒的污染。

本实验中 Western 印迹结果表明, ANG 在转染的 SK-MES-1 细胞中表达明显减弱。AAV-shANG 转染的 SK-MES-1 细胞体外实验中,其细胞增殖指数与其他组差异并无统计学意义,但是 AAV-shANG 转染 SK-MES-1 细胞移植至裸鼠体内生长显著减慢,成瘤性降低,在致瘤率、出瘤时间等方面与其他组差异并无统计学意义。结果提示抑制 ANG 的表达可降低血管内皮细胞增殖、分化,从而导致肿瘤生长缓慢,成瘤性降低,但是不能阻止肿瘤的发生。MVD 是利用针对血管内皮细胞抗原的免疫组化技术对肿瘤微血管进行定量,可直接量化反映肿瘤的血管生成程度,它反映了肿瘤微血管形成的强度与肿瘤的侵袭性^[13]。本研究中,反义载体转染细胞组肿瘤 MVD 显著减小,说明该组肿瘤血管生成数目显著减少,不能满足新生肿瘤生长和侵袭的需要,这可能是该组肿瘤生长缓慢一个重要原因。

本实验成功构建了表达 ANG 靶向的 siRNA 重组腺相关病毒,并能有效转染 SK-MES-1 细胞从而抑制 ANG 蛋白表达,进而降低肿瘤细胞成瘤性,延缓肿瘤生长速度,为肿瘤分子生物治疗提供了新的思路。但是,肿瘤组织中新生血管的形成是多因子协同的功能,如何充分利用已知的血管生成相关分子,通过协同作用特异性地抑制肿瘤组织血管的生成,是需要解决的重要问题。

[参考文献]

- [1] Fett J W, Strydom D J, Lobb R R, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells[J]. *Biochemistry*, 1985, 24: 5480-5486.
 - [2] Hisai H, Kato J, Kobune M, et al. Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 4852-4859.
 - [3] Elbashir S M, Lendeckel W, Ruschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 188-200.
 - [4] Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146: 293-309.
 - [5] Adams S A, Subramanian V. The angiogenins: an emerging family of ribonuclease related proteins with diverse cellular functions[J]. *Angiogenesis*, 1999, 3: 189-199.
 - [6] Fett J W, Strydom D J, Lobb R R, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells[J]. *Biochemistry*, 1985, 24: 5480-5486.
 - [7] King T V, Vallee B L. Neovascularization of the meniscus with angiogenin; an experimental study in rabbits[J]. *J Bone Joint Surg*, 1991, 73: 587-590.
 - [8] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 653-660.
 - [9] Aboulghar M A, Mansour R T, Serour G I, et al. Elevated concentrations of angiogenin in serum and ascitic fluid from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13: 2068-2071.
 - [10] Olson K A, Byers H R, Key M E, et al. Prevention of human prostate tumor metastasis in athymic mice by antisense targeting of human angiogenin [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 3598.
 - [11] Olson K A, Byers H R, Key M E, et al. Inhibition of prostate carcinoma establishment and metastatic growth in mice by an antiangiogenin monoclonal antibody[J]. *Int J Cancer*, 2002, 98: 923.
 - [12] Mulkeen A, Silva T, Schmitz J, et al. siRNA-mediated gene silencing in colorectal cancer: a novel anti-angiogenic targeted therapy[J]. *J Surg Res*, 2004, 121: 279-280.
 - [13] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36: 169-180.
- [收稿日期] 2006-08-09 [修回日期] 2007-03-09
[本文编辑] 曹 静

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948
CN31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725